动 物 学 研 究 2004, Jun. 25 (3): 205-213 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

基于16*S* rRNA序列的角蟾科部分属间系统关系

郑渝池，莫邦辉，刘志君，曾晓茂*
(中国科学院成都生物研究所，四川 成都 610041)

摘要：采用最大似然法（ML法）、最大简约法（MP法）、邻接法（NJ法）对来自角蟾科 Megophryidae（Anura）8属17种及外群2种共25条400 bp左右的线粒体16*S* rRNA序列进行系统发育关系分析。结果表明，用于分析的所有角蟾科物种形成两大支，第一支包括 *Megophrys*，*Brachytarsophrys* 和 *Atympanophrys*，第二支包括 *Leptobrachium*，*Leptolalax*，*Scutiger*，*Oreolalax* 和 *Vibrissaphora*。支持将角蟾科划分为两大类群，即第一支属于 Megophryini 族，第二支属于 Leptobrachiini 族。根据分子钟模型初步推测两类群间的分歧时间大致为14.2～18.7百万年前。在 Megophryini 族中，基因树的拓扑结构不支持 *Atympanophrys* 建立后的 Megophrys 为单系；而在 Leptobrachiini 族中，*Leptolalax* 为一有效属，其系统发生较早。

关键词：角蟾科；16*S* rRNA；系统发育；拓扑结构
中图分类号：Q959.53；Q951.3 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2004)03-0205-09

Phylogenetic Relationships of Megophryid Genera (Anura: Megophryidae) Based on Partial Sequences of Mitochondrial 16*S* rRNA Gene

ZHENG Yu-chi, MO Bang-hui, LIU Zhi-jun, ZENG Xiao-mao
(*Chengdu Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China*)

Abstract: Phylogenetic relationships of 8 genera of Megophryidae (Anura) were discussed based on 25 partial sequences of mitochondrial 16*S* rRNA gene. Maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbor joining analyses were performed on the dataset. The ingroup was divided into two major clades, Clade 1 and Clade 2, on the gene tree. Clade 1 included *Megophrys*, *Brachytarsophrys* and *Atympanophrys*, while *Leptolalax*, *Oreolalax*, *Scutiger*, *Leptobrachium* and *Vibrissaphora* belonged to Clade 2. This met the result of morphological study. It was primarily estimated that the divergence age of two clades occured 14.2-18.7 million years ago. The topology of Clade 1 did not support *Megophrys* to be a monophyletic group. In Clade 2, *Leptolalax* was believed to be a valid genus and was the taxon that occurred much early.

Key words: Megophryidae; 16*S* rRNA; Phylogeny; Topology

Ford & Cannatella (1993) 根据 Cannatella (1985) 对原始无尾类各科系统发育关系的研究，提出将角蟾亚科 Meophryinae 提升为角蟾科 Megophryidae。该科由亚洲原隶锄足蟾科的全部属种组成。角蟾科是原始无尾两栖类（archaeobatrachians）中物种和形态多样性最丰富的一个科，分布于巴基斯坦、印度、中国西部向东至东南亚的菲律宾群岛直至苏达群岛（Sunda Islands）的广大区域，现含以下各属：*Atympanophrys*，*Brachytarsophrys*，*Leptobrachella*，*Leptobrachium*，*Leptolalax*，*Megophrys*，*Ophryophryne*，*Oreolalax*，*Scutiger* 和 *Vibrissaphora*，共约110种（Zhao et al，2000；Frost，

收稿日期：2003-08-25；接受日期：2004-02-10
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30070090）；中国科学院知识创新工程项目（KSCX2-1-09）；中国科学院西南基地创新工程支持
* 通讯作者，E-mail：zengxmxu@yahoo.com，Tel：028-85241980

2002)。

Tian & Hu (1985) 根据形态学特征将中国该科属种划分为角蟾类和齿蟾类，Huang et al (1991) 提出中国该科各属蝌蚪口内部结构可归纳为角蟾型和拟髭蟾型两个基本类型，Dubois & Ohler (1998) 总结该科可划分为 Megophryini 族和 Leptobrachiini 族。虽然上述各研究提出的类群名称不同，但得出了相互一致的角蟾科两大类群的划分。核型方面，角蟾科里存在着 $2n=26$ (6+7) 和 $2n=26$ (5+8) 两种基本核型 (Morescalchi, 1973; Zheng & Wu, 1989; Li et al, 1990; Rao & Yang, 1997)，但这两种基本核型各自包括的属种并不和上述基于形态学划分的两大类群相一致 (Rao & Yang, 1997)。

Tian & Hu (1983) 根据形态学特征将 *Megophrys shapingensis* 从 *Megophrys* 中划出另立新属 *Atympanophrys*，这引发了一系列围绕 *Atympanophrys* 是否为有效属的讨论 (Dubois, 1986; Fei et al, 1990; Huang et al, 1991; Ye et al, 1993; Zhao & Zhao, 1994; Matsui, 1997; Li & Hu, 1996; Rao, 1997; Rao & Yang, 1997; Xie & Wang, 2000; Zheng et al, 2002; Jiang et al, 2003)。

Leptolalax 原为 *Leptobrachium* 的一个亚属 (Dubois, 1980, 1981)，Dubois (1983) 将 *Leptolalax* 提升为属级分类阶元 (Frost, 2002)。Lathrop (1997) 指出 *Leptolalax* 属的物种缺乏共近裔形态学特征，对前者的观点提出了异议。Li et al (1991) 根据核型特征指出 *Leptolalax* 在其所属类群里系统发生较晚，但该文同时提到这样的安排使 *Leptolalax* 所属类群的核型演化方向与两栖动物核型的主要演化方向不一致。

本文拟通过对该科部分属种线粒体 16*S* rRNA 序列数据进行系统发育分析，为讨论上述问题提供分子层次的信息。

1 材料和方法

1.1 材 料

本文采用 Zhao et al (2000) 的物种名录，其中种名 *Megophrys lateralis* 应为 *M. major* (Fei & Ye, 2000; Forst, 2002)，故本文采用 *M. major* 而非 *M. lateralis*。共有 17 号标本的肌肉组织被用于提取 DNA、扩增和测序 (表 1)，除 1 号 *Atympanophrys shapingensis* 标本 (XM967) 为 −20 ℃保存外，其余均为 90%酒精保存。另外 8 条 16*S* rRNA 部分序列得自 NCBI，其所属物种和登录号分别为 *Leptobrachium chapaense* (AF285188)，*Leptolalax pelodytoides* (AF285192)，*Leptolalax pelodytoides* (AY236797)，*Megophrys major* (AF285195)，*M. major* (AY236800)，*Brachytarsophrys feae* (AY236799)，*Pelobates syriacus* (AY236807) 和 *P. varaldii* (AY236810)。

1.2 总 DNA 的提取、16*S* rRNA 片段的扩增和序列测定

每号标本取肌肉 0.1~0.2 g，剪碎混合少量石英砂，在液氮中充分研磨。然后加入 SDS 在 37 ℃下水浴 1.5 h，5 000 r/min 15 min 氯仿离心抽提 2 次，上清液中加入 2 倍体积 −20 ℃乙醇沉淀 DNA，13 000 r/min 离心 10 min，倒出液体后离心管倒置 −20 ℃冻干 10 min。在离心管中加水溶解 DNA，4 ℃保存 12 h 以上。

PCR 扩增引物为通用引物 P7 (5'-CGCCTGTTTACCAAAAACAT-3') /P8 (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Simon et al, 1994)，目的序列位于线粒体 16*S* rRNA 基因上。反应体积 50 μL，含 DNA 模板 40~60 ng，10×PCR Buffer 5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μL，2 mmol/L dNTP 5 μL，P7、P8 各 10 pmol，*Taq* 酶 2 U。在 PTC-100 热循环仪上进行 PCR 扩增，循环参数为 94 ℃预变性 4 min；接 35 次循环，94 ℃变性 30 s，54 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 60 s，最后 72 ℃延伸 5 min。

PCR 产物送上海基康生物技术有限公司测序。

1.3 序列分析

采用 Clustal X 1.81 软件 (Thompson et al, 1997) 进行全部 25 条序列的对位排列，辅以人工校对。进行系统发育分析时以 *Pelobates syriacus* 和 *Pelobates varaldii* 作为外群，其所属的科 Pelobatidae 与 Megophryidae 互为姐妹群 (Mario et al, 2003)。

在 Model Test 3.06 (Posada & Crandall, 1998) 中选择最适合本文数据集的序列演化模型以供最大似然法 (ML 法) 分析。运用 PAUP* 4.0b10 软件 (Sworfford, 1998) 启发式搜索 ML 树，20 次重复随机加入序列，分支交换算法采用树二等分再连接法 (TBR) (Swofford & Begle, 1993)。对该树拓扑结构可信度的评估采用 Bootstrap 法 (Felsenstein, 1985) 200 次重复计算节点支持率，搜索方式为快速逐步递增的启发式搜索。

表 1　测序的 17 号角蟾科动物标本

Table 1　17 specimens of Megophridae sequenced in this study

种名 Species	标本号 Voucher no.	采集地 Locality	海拔 Altitude (m)	经度 Longitude	纬度 Latitude
Atympanophrys shapingensis 沙坪无耳蟾	XM095	四川彭县银厂沟 Yinchang River, Sichuan Province	2 000	E103°55.000′	N31°18.000′
Atympanophrys shapingensis 沙坪无耳蟾	XM967	四川冕宁县冶勒乡 Yele Village, Sichuan Province	2 600	E102°11.404′	N28°55.614′
Brachytarsophrys platyparietus 平顶短腿蟾	W01395	云南昆明谷律 Gulü, Yunnan Province	1 900	E102°42.000′	N25°00.000′
Leptolalax oshanensis 峨山掌突蟾	ZYC799	重庆南川市金佛山 Jinfu Mount, Chongqing Municipality	1 400	E107°12.685′	N29°02.347′
Megophrys spinatus 棘指角蟾	ZYC644	贵州江口县梵净山 Fanjing Mount, Guizhou Province	860	E103°42.918′	N27°53.772′
Megophrys minor 小角蟾	XM1058	贵州绥阳县宽阔水 Kuankuoshui, Guizhou Province	1 350	E107°10.597′	N28°12.959′
Megophrys nankiangensis 南江角蟾	XM835	四川南江县大江口 Dajiangkou, Sichuan Province	1 750	E106°42.775′	N32°34.858′
Oreolalax popei 宝兴齿蟾	XM519	四川峨眉山 Omei Mount, Sichuan Province	1 800	E103°21.061′	N29°33.131′
Oreolalax popei 宝兴齿蟾	XM516	四川峨眉山 Omei Mount, Sichuan Province	1 660	E103°21.829′	N29°33.036′
Oreolalax rhodostigmatus 红点齿蟾	ZYC675	贵州绥阳县宽阔水 Kuankuoshui, Guizhou Province	1 050	E107°12.325′	N28°14.256′
Oreolalax rhodostigmatus 红点齿蟾	ZYC768	重庆南川市金佛山 Jinfu Mount, Chongqing Municipality	1 100	E107°11.679′	N29°04.077′
Oreolalax lichuanensis 利川齿蟾	ZYC787	重庆南川市金佛山 Jinfu Mount, Chongqing Municipality	1 700	E107°12.302′	N29°02.390′
Scutiger boulengeri 西藏齿突蟾	XM111k	四川若尔盖包座乡 Baozuo Village, Sichuan Province	3 050	E103°23.388′	N33°24.977′
Scutiger boulengeri 西藏齿突蟾	XM1091	西藏林芝色季拉山 Sejila Mount, Xizang Autonomous Region	3 850	E94°18.000′	N29°30.000′
Scutiger chintingensis 金顶齿突蟾	XM1045	四川洪雅县瓦屋山 Wawu Mount, Sichuan Province	2 500	E102°57.120′	N29°38.350′
Vibrissaphora boringii 峨嵋髭蟾	XM454	四川峨眉山 Omei Mount, Sichuan Province	1 000	E103°24.978′	N29°33.499′
Vibrissaphora liui 崇安髭蟾	ZYC602	湖南张家界天子山 Tianzi Mount, Hunan Province	450	E110°30.360′	N29°22.291′

用 PAUP* 4.0b10 中的最大简约法（MP 法）启发式搜索 MP 树，搜索参数设为将排序引入的空位作为缺失数据、50 次重复随机加入序列、TBR 分支交换算法。在构建关系较远的一组序列的 MP 树时，慢演化位点（颠换）比快演化位点（转换）更有用，如果给颠换更多的权重可能会比不加权时得到一棵更可靠的树（Farris，1969；Swofford et al，1996）。由于怎样认定序列间的"关系较远"并无统一的标准，故分析中对数据集采用了不加权和加权两种处理方法。在 MEGA 2.1（Kumar et al，2001）中选择 Kimura 2-parameter 模型计算序列间的转换/颠换比，将数据集总的转换/颠换比作为对转换和颠换加权权重的依据（Nei & Kumar，2000）。对 MP 树拓扑结构可信度的评估采用 Bootstrap 法 1 000 次重复计算节点支持率，并结合 AutoDecay 5.0（Eriksson，2001）计算节点的衰减指数（decay index）。

在 MEGA 2.1 中根据序列间的分歧程度选择 Kimura 2-parameter 模型运用邻接法（NJ 法）构建 NJ 树（Nei & Kumar，2000），分析时将因排序引入的空位成对删除，10 000 次重复 Bootstrap 法计算该树的节点支持率。

运用软件 PHYLTEST 2.0（Kumar，1996）中的 Kimura 2-parameter 模型和 P 距离模型，通过相对速率检测（relative rate test）来评估类群间的核苷酸取代速率是否符合分子钟模型（Zukerkandl & Paul-

ing，1965)。类群间的平均P距离由MEGA 2.1软件计算，因排序引入的空位成对删除。

联合运用PAUP* 4.0b10和MacClade 4.0 (Madison & Madison，2000)进行树拓扑结构的比较。ML树拓扑结构的比较采用Kishino-Hasegawa (Kishino & Hasegawa，1989)检验，参数设置为常态逼近(normal approximation)，双尾检验；非加权MP树拓扑结构的比较采用Templeton双尾检验(Templeton，1983)。

2 结 果

共测得17号标本长400 bp左右的线粒体16*S* rRNA片段序列并在GenBank注册(AY526199—AY526215)。所测序列与得自NCBI的8条同源序列经对位排列后生成的数据集共421个位点，含变异位点199个、简约信息位点176个，碱基A、C、G、T平均含量分别为32.4%、22.4%、18.6%、26.5%。

最适合本文数据集的模型为GTR+G，$-\ln L=3054.6892$。该模型参数如下：碱基频率A(0.3414)、C(0.2143)、G(0.1729)、T(0.2714)，碱基替代率A-C(5.9621)、A-G(18.8056)、A-T(14.7438)、C-G(0.0000)、C-T(62.7481)、G-T(1.0000)，γ分布外形参数(gamma distribution shape parameter)为0.3160。基于此模型运用最大似然法启发式搜索得到1棵ML树(图1)，$-\ln L=3046.19322$，其200次重复Bootstrap计算出的节点支持率见表2。该树的拓扑结构表明内群8属分成两大支系。第一支由*Atympanophrys*，*Brachytarsophrys*和*Megophrys*构成：*Brachytarsophrys*为该支其他2属5种的姊妹群，而这5种中由*Megophrys minor*和*M. spinatus*构成的一支最先分出，余下3种中*M. major*为*M. nankiangensis*和*Atympanophrys shapingensis*的姊妹群。第二支由*Leptolalax*，*Leptobrachium*，*Vibrissaphora*，*Oreolalax*和*Scutiger*构成：其中*Leptolalax*和其他4属互为姊妹群，余下4属中*Leptobrachium*和*Vibrissaphora*互为姊妹群，*Oreolalax*和*Scutiger*两属物种各自聚成一支，但它们和*Leptobrachium*和*Vibrissaphora*一支的系统关系未能解决。

不对位点加权，启发式搜索得到1棵步长为571的MP树，CI=0.550，RI=0.761，RC=0.418，其1 000次Bootstrap节点支持率和衰减指数见表2。由于数据集总的转换/颠换比为1.526，故在运用加权简约法时赋予转换权重2、颠换3，启发式搜索得到1棵MP树，其拓扑结构和上述MP树完全相同、节点支持率相差无几、而衰减指数较前者高(表2)。MP树和ML树的拓扑结构相似(附录1)，也分为两大支系，第一支两者完全相同，MP树第二支属间拓扑结构为(*Leptolalax*，(*Leptobrachium*，(*Vibrissaphora*，(*Oreolalax*，*Scutiger*))))。

邻接法分析构建了1棵NJ树，其10 000次Bootstrap节点支持率见表2。NJ树的拓扑结构见附录1，分为两大支系，它们的属种组成与ML树相同。NJ树第一支的拓扑结构和ML树第一支node5、node7互换后的结构相同(图1)；第二支中*Leptolalax*最先分出，余下4属中*Leptobrachium*和*Vibrissaphora*互为姊妹群，而这一支又和由*Oreolalax*和*Scutiger*两属物种混合构成的一支互为姊妹群。

ML树、MP树、NJ树的拓扑结构相似，在表达属间系统关系上三者共有8个节点是完全一致的，这8个节点编号分别为：node2，node3，node6，node7，node9，node10，node11和node13(图1，表2)。

在相对速率检测中，选择上述两大支系分别为Cluster A和Cluster B、外群为Cluster C。在Kimura 2-parameter模型下，$La=0.1279$，$Lb=0.1452$，$La-Lb=-0.0173+0.0213$，$Z=0.8153$表明核苷酸取代速率恒定性在5%水平上不被拒绝。相似的在P距离模型下，$La=0.1070$，$Lb=0.1199$，$La-Lb=-0.0129+0.0151$，$Z=0.8537$也表明核苷酸取代速率恒定性在5%水平上不被拒绝。这样的结果显示两大支系用于分析的序列的演化符合分子钟模型。两大支系间的平均*P*距离为0.2269+0.0310(*P* distance+1.96 *SD*)。

改变ML树第一支(node 2)的拓扑结构，使*Atympanophrys*一支和本分析中*Megophrys*所有物种互为姊妹群，通过Kishino-Hasegawa检验比较这两种拓扑结构，结果(似然率差值=6.1458，$P<0.05$)显示两者存在显著的差异。同样改变非加权MP树的拓扑结构，使*Atympanophrys*和*Megophrys*互为姊妹群，Templeton检验结果(树长差值=7，$P=0.0348<0.05$)表明两种拓扑结构间存在显著的差异。

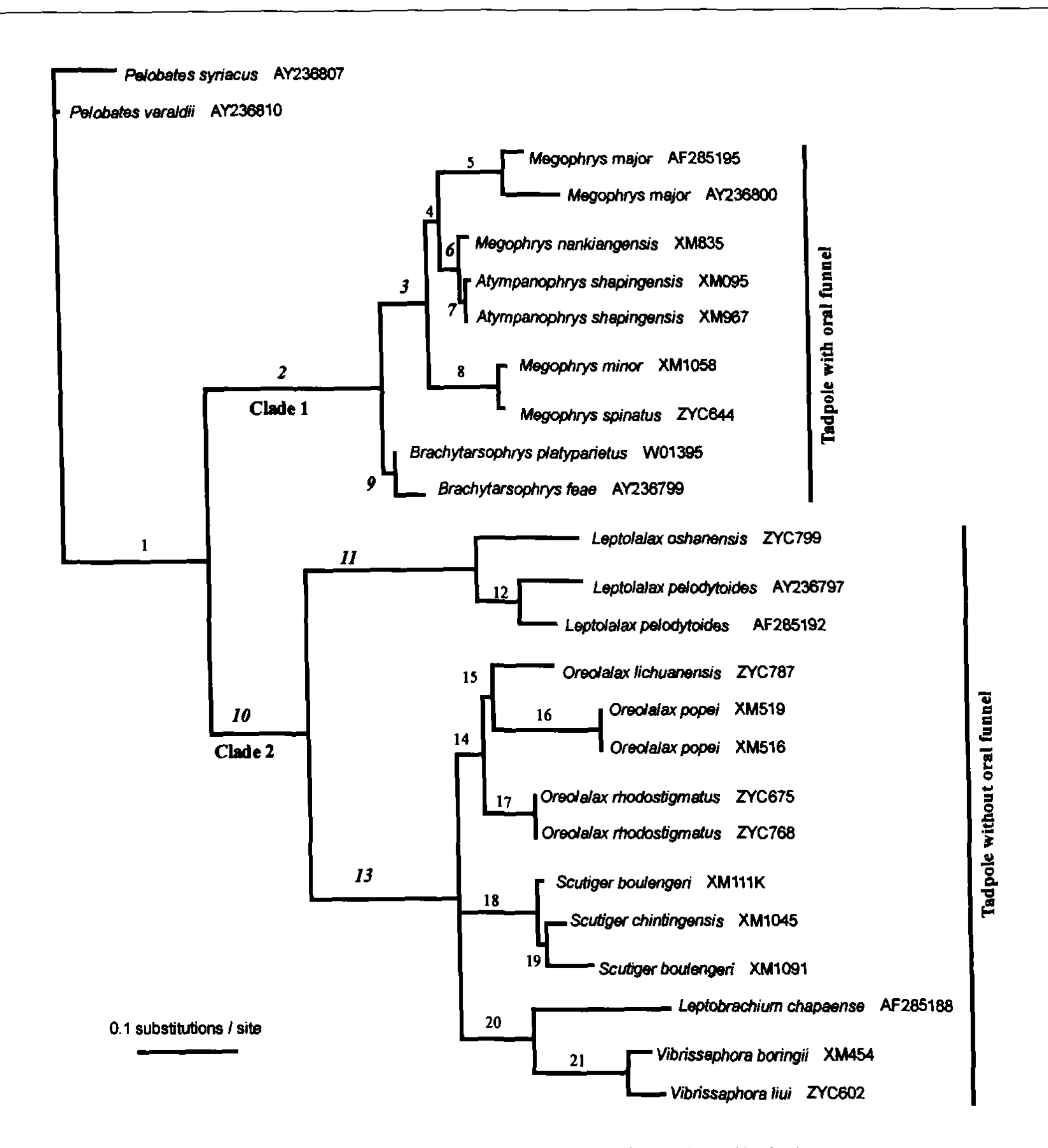


图1 基于16*S* rRNA序列的角蟾科8属间系统关系

Fig.1 Phylogenetic analyses of the mitochondrial 16*S* rRNA gene of 8 genera in Megophryidae

图中为ML树，其 - lnL = 3046.19322。树上所有节点均被编号，其支持值见表2，包括MP、ML、NJ树上相应节点的bootstrap百分率和MP树上相应节点的衰减指数。本文讨论部分涉及的节点用粗斜体显示。属于Clade 1物种的蝌蚪具口漏斗，而Clade 2物种的蝌蚪不具该结构。

Shown is the tree inferred by the maximum likelihood method (- lnL = 3046.19322). Support values (MP, ML, and NJ probability percentages of bootstrap replicates and decay indices) for the numbered nodes are provided in Table 2. Nodes corresponding to following discussion are indicated in the bold and italic. Tadpole of Clade 1 has a broad oral funnel that does not emerge in Clade 2.

3 讨 论

3.1 角蟾科两大类群的划分及分歧时间的初步推测

Tian & Hu (1985) 根据成体和蝌蚪形态学特征将中国锄足蟾科9属划分为两大类群，分别为角蟾类（*Megophrys*, *Ophryophryne*, *Brachytarsophrys* 和 *Atympanophrys*）和齿蟾类（*Oreolalax*, *Scutiger*, *Leptolalax*, *Leptobrachium* 和 *Vibrissaphora*）。在解剖比较17种蝌蚪口内部结构后，Huang et al (1991) 提出中国锄足蟾科各属蝌蚪口内部结构可归纳为两个基本类型，即角蟾型（*Megophrys* 和 *Ophryophryne*）和拟髭蟾型（*Oreolalax*，*Scutiger*，*Leptolalax*，*Leptobrachium* 和 *Vibrissaphora*），在该研究中，*Brachytarsophrys carinensis* 和 *Atympanophrys shapingensis* 两种作为 *Megophrys* 一属的物种被解剖比较。Dubois & Ohler (1998) 总结前人工作后认为亚洲的锄足蟾科动物可划分为两族，Megophryini 族包括 *Ophryophryne*，*Megophrys*（*Megophrys*），*Megophrys*（*Atympanophrys*），*Megophrys*（*Brachytarsophrys*）和

表2 ML树节点支持值，以及MP和NJ树与ML树共有节点的支持值

Table 2 Support values for ML nodes, and MP and NJ nodes shared by the ML phylogeny

Node	ML	MP (unweighted)		MP (weighted)		NJ
	BP	BP	DI	BP	DI	BP
1	99	100	19	100	48	100
2	***100***	***100***	***15***	***100***	***42***	***100***
3	***82***	***37***	***1***	***32***	***6***	***75***
4	32	37	1	32	6	—
5	98	93	5	94	18	99
6	***52***	***91***	***4***	***100***	***10***	***99***
7	***39***	***80***	***2***	***79***	***5***	***94***
8	100	100	16	100	41	100
9	***80***	***98***	***5***	***100***	***14***	***99***
10	***74***	***79***	***3***	***84***	***14***	***72***
11	***100***	***100***	***14***	***100***	***39***	***100***
12	90	87	5	78	13	87
13	***97***	***97***	***10***	***100***	***31***	***99***
14	41	56	2	41	7	—
15	40	41	2	38	6	—
16	100	100	15	100	41	100
17	100	100	10	100	23	100
18	98	100	11	100	28	100
19	63	—	—	—	—	—
20	78	—	—	—	—	73
21	100	100	14	100	39	100

BP: bootstrap 百分率 (Probability percentages of bootstrap replicates); DI: 衰减指数 (Decay indices)。节点编号源自图1。破折号表示ML树上的相应节点在MP和/或NJ树上不存在。本文讨论部分涉及的节点用粗斜体显示。

Node numbers correspond to those in Fig. 1. Dashes represent nodes that do not exist on MP and/or NJ trees. Nodes corresponding to following discussion are indicated in bold and italic.

Megophrys (*Xenophrys*)，而 Leptobrachiini 族包括 *Leptobrachium* (*Leptobrachium*)，*Leptobrachium* (*Vibrissaphora*)，*Leptobrachella*，*Leptolalax*，*Oreolalax* 和 *Scutiger*。由于角蟾科由亚洲原隶属锄足蟾科的全部属种组成，故上述研究的对象为角蟾科动物，虽然在某些分类单元是作为属级还是亚属级分类阶元方面存在不同意见，但都得出了相互一致的角蟾科两大类群的划分。

本文中基因树上由 node 2 和 node 10 分别界定的两大支系 Clade 1 和 Clade 2 属的组成符合上述类群组成（图1），且都有较高的节点支持率（表2）；故 16*S* rRNA 基因序列提供的信息支持前人形态学的工作，将角蟾科划分为两大类群。由于角蟾科可划分为两个类群的思想最早由 Dubois (1980) 提出，这里仍沿用其所用类群名称，Leptobrachiini 族和 Megophryini 族。虽然我们的分子系统学分析没有包括 *Ophryophryne* 和 *Leptobrachella* 两属的物种，但参考形态学研究资料（Tian & Hu，1985；Huang et al，1991；Dubois & Ohler，1998）后建议暂时将 *Ophryophryne* 纳入 Megophryini 族、将 *Leptobrachella* 纳入 Leptobrachiini 族。这样角蟾科两大类群的组成可暂订为：Megophryini族（*Megophrys*，*Ophryophryne*，*Atympanophrys* 和 *Brachytarsophrys*），Leptobrachiini 族（*Oreolalax*，*Leptobrachium*，*Leptolalax*，*Leptobrachella*，*Scutiger* 和 *Vibrissaphora*）。Megophryini 族蝌蚪均具口漏斗，而在 Leptobrachiini 族中没有这种

情况（图 1），同时在系统发育关系和角蟾科最近的 Pelobatidae 和 Pelodytidae 两科（Mario et al，2003）中没有蝌蚪口部呈漏斗状的物种。口漏斗与蝌蚪占据的生态位相关（Hora，1928；Liu & Hu，1961；Huang et al，1991），根据简约原则推测该形态特征在角蟾科中只经历了一次演化发生，但这仍需要包括 *Leptobrachella*（蝌蚪无口漏斗）和 *Ophryophryne*（蝌蚪具口漏斗）二属在内的该科全部属间系统发育关系来作为最后判断的依据。

Megophryini 族和 Leptobrachiini 族的序列演化符合分子钟模型，由于无化石资料，这里借用蟾蜍属 *Bufo*（Aurna：Bufonidae）线粒体基因的核苷酸取代速率模型（Macey et al，1998）来初步推导两族间的分歧时间（Mulcahy & Mendelson，2000）。该模型的核苷酸取代速率为 0.0069 个变化每位点每百万年（million years，MY），而 Megophryini 族和 Leptobrachiini 族间的平均 P 距离为 0.2269 + 0.0310（P distance + 1.96 SD）。根据公式 $T = d_{avg}/2r$（这里 T 为两类群间的分歧时间、d_{avg} 为两类群间的平均遗传距离、r 为核苷酸取代速率）（Kumar，1996），计算得 $T = 16.4420 + 2.2464$ MY，故初步推测两类群间的分歧时间大致为距今 18.7 ~ 14.2 MY 前。

3.2 *Megophrys* 是否单系发生

Atympanophrys 是由 *Megophrys* 划出（Tian & Hu，1983），得到核型和精子形态特征的支持（Wu，1987；Li & Hu，1996；Rao & Yang，1997；Zheng et al，2002）。但 Dubois（1986）认为 *Atympanophrys* 和 *Megophrys* 之间的差异未达到属级水平，Huang et al（1991）根据蝌蚪口内部结构也提出相同观点，且有工作表明 *Atympanophrys* 的重要建属依据 *Atympanophrys shapingensis*“无耳柱骨”属错误观察，该物种具耳柱骨（Fei et al，1990；Ye et al，1993；Rao，1997；Wu，personal comm.）。如图 1 所示 *Atympanophrys* 和 *Megophrys* 的物种在基因树上构成一支（node 3），其中 *Atympanophrys shapingensis*（node 7）和 *Megophrys nankiangensis* 互为姊妹群（node 6），这样的拓扑结构显示 *Atympanophrys* 建立后的 *Megophrys* 的物种组成没能包括其最近共同祖先的所有后裔。如 node 3 代表的是本工作纳入分析的所有 *Megophrys* 物种的最近共同祖先，但它同时也是 *Atympanophrys shapingensis* 的祖先。同时树拓扑结构的比较显示，当改变基因树拓扑的结构使 *Atympanophrys* 和 *Megophrys* 互为姊妹群时，新树与基因树的拓扑结构存在明显的差异，不支持本分析中的 *Megophrys* 物种单独构成一支。由于只有当一个类群的物种组成为其最近共同祖先的所有后裔时，这个类群才是单系，故基于 16*S* rRNA 数据的分析结果显示 *Atympanophrys* 建立后的 *Megophrys* 不是单系，间接支持 *Atympanophrys* 不成立的观点。

Rao & Yang（1997）根据染色体和形态性状从 *Megophrys* 中划出一新属 *Panophrys*；Dubois & Ohler（1998）对此做了讨论并指出 *Panophrys* 为 *Xenophrys* 的同物异名，该订正得到了较广泛的认同（Frost，2002；AmphibiaWeb，2003），但 Dubois & Ohler（1998）建议暂时将 *Xenophrys* 作为 *Megophrys* 的一个新亚属。按上述两个报道中对物种的安排，中国已没有 *Megophrys* 或 *Megophrys*（*Megophrys*）的物种分布，本文分析中包括的 *Megophrys major*，*M. spinatus*，*M. minor* 和 *M. nankiangensis* 4 种均被纳入 *Xenophrys* 或 *Megophrys*（*Xenophrys*）。这样，*Atympanophrys shapingensis* 在基因树上仍然镶嵌于 *Xenophrys* 或 *Megophrys*（*Xenophrys*）各物种之中（图 1），揭示 *Xenophrys* 或 *Megophrys*（*Xenophrys*）不是单系。

3.3 *Leptolalax* 的有效性及其系统发育地位

Leptolalax 原为 *Leptobrachium* 的一个亚属（Dubois，1980，1981）。在没有进行更深入的系统发育研究的情况下，Dubois（1983）将 *Leptolalax* 提升为属级分类阶元（Frost，2002）。Lathrop（1997）指出 *Leptolalax* 属的物种缺乏共近裔形态学特征，对前者的观点提出了异议。由于图 1 上 Leptobrachiini 族（Clade 2）中 *Leptolalax* 一支（node 11）和其余 4 属构成的另一支（node 13）互为姊妹群，且这样的拓扑结构有高的节点支持率（表 2），故我们的工作支持 *Leptolalax* 作为一有效属。

关于 *Leptolalax* 在 Leptobrachiini 族系统发育关系中所处的位置，Li et al（1991）根据 2n = 26、双臂染色体（M）占绝大多数的核型在该族中占优势为原始核型，推导出拥有 2n = 24、部分单臂染色体（T）核型的 *Leptolalax* 在该族中较特化、系统发生较晚。但该文同时指出，在特化核型中出现 T，而在原始核型中却保留以 M 为主，这种情况与两栖动物核型的主要演化方向（T→M）不一致。而本文基因树中 *Leptolalax* 位于 Leptobrachiini 族一支的基部，和其余 4 属互为姊妹群，暗示 Leptobrachiini 族

的核型演化可能同两栖动物核型的主要演化方向(T→M)一致，拥有部分T的*Leptolalax*在该族中的系统发生较早。

致谢：中国科学院昆明动物所饶定齐老师提供*Brachytarsophrys platyparietus*标本；中国科学院昆明动物所庞峻峰老师，中国科学院成都生物研究所吴贯夫、江建平、谢峰、李成老师对本文的写作提供了宝贵意见，在此一并致谢。

参考文献：

AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2003. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: http://amphibiaweb.org/. (Accessed: 2002).

Cannatella DC. 1985. A Phylogeny of Primitive Frogs (Archaeoatrachians) [D]. Ph. D. thesis, the University of Kansas, Lawrence.

Dubois A. 1980. Notes sur la systematique et la repartition des amphibiens anoures de Chine et des regions avoisinantes: Ⅳ. Classification Generique et subgenerique des Pelobatidae Megophryinae [J]. *Bulletin Mensuel de la Société Linnèenne de Lyon*, **49**: 469-482.

Dubois A. 1981. Notes sur la systematique et la repartition des amphibiens anoures de Chine et des regions avoisinantes: Ⅴ. *Megophrys oshanensis* Liu, 1950 et *Leptobrachium minimum* Taylor, 1962 [J]. *Bulletin Mensuel de la Société Linnénne de Lyon*, **51**: 183-192.

Dubois A. 1983. Note preliminaire sur le genre Leptolalax Dubois, 1980 (Amphibiens, Anoures), avecdiagnose d'une espece nouvelle du Vietnam [J]. *Alytes*, **2** (4): 147-153.

Dubois A. 1986. Miscellanea taxonmica batrachological (1) [J]. *Alytes*, **5** (1-2): 7-95.

Dubois A, Ohler A. 1998. A new species of *Leptobrachium* (*Vibrissaphora*) from northen Vietnam, with a review of the taxonomy of the genus *Leptobrachium* (Pelobatidae, Megophryinae) [J]. *Dumerilia*, **4** (1): 1-32.

Eriksson T. 2001. AutoDecay Version 5.0 [CP]. Stockholm: Bergius Foundation, Royal Swedish Academy of Sciences.

Farris JS. 1969. A successive approximations approach to character weighting [J]. *Systematic Zoology*, **18**: 374-385.

Fei L, Ye CY. 2000. Taxonomic discussion of *Megophrys lateralis* (Anderson) and related species (Amphibia: Pelobatiae) [J]. *Cultum Herpetologica Sinica*, **8**: 59-63. [费 梁，叶昌媛. 2000. 白颌大角蟾及其相关物种的分类探讨（两栖纲：锄足蟾科）. 两栖爬行动物学研究，**8**: 59-63.]

Fei L, Ye CY, Huang YZ. 1990. Key to Chinese Amphibia [M]. Chongqing: Chongqing Branch, Science and Technolog Literature Publishing House. [费 梁，叶昌媛，黄永昭. 1990. 中国两栖动物检索. 重庆：科学科技文献出版社重庆分社.]

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, **39**: 783-791.

Ford LS, Cannatella DC. 1993. The major clades of frogs [J]. *Herpetological Monographs*, **7**: 94-117.

Frost DR. 2002. Amphibian Species of the World: An online reference. V2.21 (15 July 2002). Electronic database available at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html.

Hora SL. 1928. Further observations on the oral apparatus of the tadpoles of the genus *Megalophrys* [J]. *Rec. Ind. Mus.*, **30**: 139-145.

Huang YZ, Fei L, Ye CY. 1991. Studies on internal oral structures of tadpoles of Chinese Pelobatidae [J]. *Acta Biologica Plateau Sinica*, **10**: 71-99. [黄永昭，费 梁，叶昌媛. 1991. 中国锄足蟾科（Pelobatidae）蝌蚪口内部结构的研究. 高原生物学集刊，**10**: 71-99.]

Jiang JP, Yuan FR, Xie F, Zheng ZH. 2003. Phylogenetic relationships of some species and genera in megophryids inferred from partial sequences of mitochondrial 12*S* and 16*S* rRNA genes [J]. *Zool. Res.*, **24** (4): 241-248. [江建平，袁富蓉，谢 峰，郑中华. 2003. 基于线粒体12*S*和16*S*基因部分序列的角蟾亚科部分属种的系统发育关系. 动物学研究，**24** (4): 241-248.]

Kishino H, Hasegawa M. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea [J]. *Journal of Molecular Evolution*, **29**: 170-179.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, **17** (12): 1244-1245.

Kumar S. 1996. PHYLTEST: Phylogenetic hypothesis testing software. Version 2.0 [CP]. Pennsylvania: Pennsylvania State University, University Park.

Lathrop A. 1997. Taxonomic review of the megophryid frogs (Anura: Pelobatoidea) [J]. *Asiatic Herpetological Research*, **7**: 68-79.

Li SS, Hu JS. 1996. Studies on karyotype and Ag-NORs of four anura species [J]. *Chinese Journal of Zoology*, **31** (6): 13-16. [李树深，胡健生. 1996. 四种无尾两栖动物的核型和银染. 动物学杂志，**31** (6): 13-16.]

Li SS, Fei L, Ye CY. 1990. A study of the karyotype, C-banding and Ag-NORs on two *Vibrissaphora* toad species (Pelobatidae, Anura) [J]. *Acta Genetica Sinica*, **17** (3): 211-215. [李树深，费 梁，叶昌媛. 1990. 两种髭蟾的Ag-NORs、C-带及核型的研究. 遗传学报，**17** (3): 211-215.]

Li SS, Fei L, Ye CY. 1991. Cytogenetic studies on two *Leptolalax pelobatoids* (Pelobatidae, Anura) from China [J]. *Acta Genetica Sinica*, **18** (6): 495-499. [李树深，费 梁，叶昌媛. 1991. 中国两种掌突蟾（锄足蟾科Pelobatidae，无尾目Anura）的细胞遗传学研究. 遗传学报，**18** (6): 495-499.]

Liu CC, Hu SQ. 1961. Tailless Amphibians of China [M]. Beijing: Science Press. 30-34. [刘承钊，胡淑琴. 1961. 中国无尾两栖类. 北京：科学出版社. 30-34.]

Macey JR, Schulte JA Ⅱ, Larson A, Fang ZL, Wang YZ, Tunijev BS, Papenfuss TJ. 1998. Phylogenetic relationships of toads in the *Bufo bufo* species group from the eastern escarpment of the Tibetan Plateau: A case of vicariance and dispersal [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9** (1): 80-87.

Madison DR, Maddison WP. 2000. MacClade, Version 4.0 [CP]. Sunderland: Sinauer Associates.

Mario GP, Daniel RB, Gabriela PO. 2003. Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **28** (1): 12-23.

Matsui M. 1997. Call characteristics of Malaysian *Leptolalax* with a description of two new species (Anura: Pelobatidae) [J]. *Copeia*, **1997** (1): 158-165.

Morescalchi A. 1973. Amphibia [A]. In: Chiarelli AB, Capanna C. Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution [C]. New York: Academic Press. 233-348.

Mulcahy DG, Mendelson JR Ⅲ. 2000. Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*,

based on molecular evidence from mtDNA [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **17** (2): 173-189.

Nei M, Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics [M]. Oxford: Oxford University Press.

Posada D, Crandall KA. 1998. Model test: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, **14**: 817-818.

Rao DQ. 1997. *Megophrys shapingensis* Liu [A]. In: Zhao EM, Yang DT. Amphibians and Reptiles of the Hengduan Mountains Region [C]. Beijing: Science Press. 46-47. [饶定齐. 1997. 沙坪角蟾 *Megophrys shapingensis* Liu. 见：赵尔宓，杨大同. 横断山区两栖爬行动物. 北京：科学出版社. 46-47.]

Rao DQ, Yang DT. 1997. The karyotypes of Megophryinae (Pelobatidae) with a discussion on their classification and phylogenetic relationships [J]. *Asiatic Herpetological Research*, **7**: 93-102.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, **87** (6): 651-701.

Sworfford DL, Begle DP. 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, Version 3.1 user's manual [CP]. Champaign, IL: Illinois Natural History Survey.

Sworfford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM. 1996. Phylogenetic inference [A]. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK. Molecular Systematics, 2nd ed [C]. Sunderland: Sinauer Associates. 407-514.

Sworfford DL. 1998. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4 [CP]. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Templeton A. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes [J]. *Evolution*, **37**: 221-244.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4876-4882.

Tian WS, Hu QX. 1983. Taxonomic study on genus *Megophrys*, with descriptions of two new genera [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **2** (2): 41-48. [田婉淑，胡其雄. 1983. 我国角蟾的分类研究兼记二新属. 两栖爬行动物学报，2 (2): 41-48.]

Tian WS, Hu QX. 1985. Taxonomical studies on the primitive anurans of the Hengduan Mountains, with descriptions of a new subfamily and subdivision of *Bombina* [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **4** (3): 219-224. [田婉淑，胡其雄. 1985. 横断山地区原始无尾两栖动物的分类兼记一新亚科及铃蟾属的亚属划分. 两栖爬行动物学报，**4** (3): 219-224.]

Wu GF. 1987. Cytotaxonomical studies on Chinese pelobatids: Ⅲ. The analysis of the karyotypes of *Megophrys lateralis* and *Atympanophrys shapingensis* [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **6** (3): 45-48. [吴贯夫. 1987. 中国锄足蟾科的细胞分类学研究——Ⅲ. 白颌大角蟾和无耳蟾的核型分析. 两栖爬行动物学报，**6** (3): 45-48.]

Xie F, Wang ZW. 2000. Review on the systematics of pelobatids [J]. *Cultum Herpetological Sinica*, **8**: 356-370. [谢 峰，王祖望. 2000. 锄足蟾科系统学研究评述. 两栖爬行动物学研究，**8**: 356-370.]

Ye CY, Fei L, Hu SQ. 1993. Rare and Economic Amphibians of China [M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science & Technology. 173-175. [叶昌媛，费 梁，胡淑琴. 1993. 中国珍稀及经济两栖动物. 成都：四川科学技术出版社. 173-175.]

Zhao EM, Zhao H. 1994. Chinese Herpetological Literature, Catalogue and Indices, No.5 of Herpetoloical Series [M]. Chengdu: Publishing House of the Chengdu University of Science and Technoloy. 374. [赵尔宓，赵 蕙. 1994. 蛇蛙研究丛书（五）：中国两栖爬行动物学文献——目录及索引. 成都：成都科技大学出版社. 374.]

Zhao EM, Chang XW, Zhao H, Adler K. 2000. Revised checklist of Chinese Amphibia & Reptilia [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, **19** (3): 196-207. [赵尔宓，张学文，赵 蕙，鹰 岩. 2000. 中国两栖纲和爬行纲动物校正名录. 四川动物，**19** (3): 196-207.]

Zheng XM, Wu GF. 1989. Cytotaxonomical studies on Chinese pelobatids: Ⅴ. The karyotypes, C-bands and Ag-NORs of *Megophrys omeimontis* and *Oreolalax schmidti* [J]. *Chinese Herpetological Research*, **2** (2): 37-45.

Zheng ZH, Fei L, Ye CY, Xie F, Jiang JP. 2002. Comparative study on sperm morphology of Chinese Megophryinae and its taxonomical sense (Amphiba: Pelobatidae) [J]. *Acta Zootaxoomica Sinica*, **27** (1): 167-172. [郑中华，费 梁，叶昌媛，谢锋，江建平. 2002. 中国角蟾亚科精子形态比较及分类学讨论（两栖纲：锄足蟾科）. 动物分类学报，**27** (1): 167-172.]

Zukerkandl E, Pauling L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins [A]. In: Bryson V, Vogel HJ. Evolving Genes and Proteins [M]. New York: Academy Press. 97-166.

附录1　MP树（A）和NJ树（B）的拓扑结构
Appendix 1　Topology of MP tree (A) and NJ tree (B)

A. ((1, 2), (((((3, 4), ((5, 6), 7)), (8, 9)), (10, 11)), (((12, 13), 14), ((((((15, 16), 19), (17, 18)), ((20, 21), 22)), (23, 24)), 25))))

B. ((1, 2), (((10, 11), ((3, 4), ((8, 9), (7, (5, 6))))), ((14, (12, 13)), ((25, (23, 24)), ((15, 16), ((22, (20, 21)), (19, (17, 18))))))))

1: *Pelobates syriacus* AY236807; 2: *P. varaldii* AY236810; 3: *Megophrys major* AF285195; 4: *M. major* AY236800; 5: *Atympanophrys shapingensis* XM095; 6: *A. shapingensis* XM967; 7: *M. nankiangensis* XM835; 8: *M. minor* XM1058; 9: *M. spinatus* ZYC644; 10: *Brachytarsophrys platyparietus* W01395; 11: *B. feae* AY236799; 12: *Leptolalax pelodytoides* AY236797; 13: *L. pelodytoides* AF285192; 14: *L. oshanensis* ZYC799; 15: *Oreolalax popei* XM519; 16: *O. popei* XM516; 17: *O. rhodostigmatus* ZYC675; 18: *O. rhodostigmatus* ZYC768; 19: *O. lichuanensis* ZYC787; 20: *Scutiger chintingensis* XM1045; 21: *S. boulengeri* XM111K; 22: *S. boulengeri* XM1091; 23: *Vibrissaphora boringii* XM454; 24: *V. liui* ZYC602; 25: *Leptobrachium chapaense* AF285188。